β2糖蛋白Ⅰ第五结构域及其突变体、短肽片段的原核表达及活性分析

李明英，王仁军，张帆，迟彦 *

（大连大学生命科学与技术学院，糖脂代谢重点实验室, 大连 116622）

摘要：β2糖蛋白Ⅰ（beta 2- glycoprotein Ⅰ，β2GPⅠ）是抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome，APS) 血清中抗磷脂抗体(antiphospholipid antibody，aPL)的主要抗原。β2GPⅠ 通过第五结构域与阴性磷脂oxLDL结合，进而被aPL识别，是APS动脉血栓发生的关键事件。本研究构建了编码β2GPⅠ第五结构域（ß2GPⅠ-DⅤ）、ß2GPⅠ-DⅤ突变体及ß2GPⅠ-DⅤ的Phe^{280}-Ala^{320}片段的原核表达载体，对其进行诱导表达和纯化，解析了ß2GPⅠ-DⅤ与阴性磷脂结合的分子机制，结果表明，β_2GPI-DV中Cys^{281}-Cys^{288}以及Ser^{311}-Lys^{317}区段在空间上维持一定构型是与CL结合所必须的前体条件，而C^{245}-C^{296}，C^{288}-C^{326}两个二硫键在维持二者空间构型方面起到一定的作用。在此基础上，我们进一步检测了具有结合CL生物学活性的rDV结合oxLDL以及APS血清中oxLDL的活性，表明rDV具有与天然β2GPⅠ相一致的生物学活性。本研究获得的rß2GPⅠ-DⅤ，以及与oxLDL结合的方法体系的建立，为APS早期实验室诊断奠定基础。

关键词：抗磷脂综合征，β2 糖蛋白Ⅰ，心磷脂，氧化低密度脂蛋白，原核表达

The prokaryotic expression and activity analysis of the fifth domain of ß2GPⅠ and its mutants or short peptide fragments

Abstract: Beta 2-glycoprotein Ⅰ（β2GPI）is the main antigen of antiphospholipid antibody (aPL) in serum of antiphospholipid syndrome (APS). β2GPI binding to oxLDL via its the fifth domian and then subsequently recognized by aPL is a key event in the development of APS arterial thrombosis. In this study, a prokaryotic expression vector encoding β2GPI fifth domain (ß2GPI-DV), ß2GPI-DV mutant and the Phe280-Ala320 fragment of ß2GPI-DV were constructed, their induced expression and purification were performed, and the molecular mechanism of the binding of ß2GPI-DV to negative phospholipids was analyzed. Our results showed that the spatial

configuration of the Cys281-Cys288 and Ser311-Lys317 segments in ß2GPI-DV, which are maintained by the two disulfide bonds in C245-C296 and C288-C326, is a necessary precursor condition for the binding to CL. On this basis, we further examined the binding activity of rDV to oxLDL and oxLDL in the serum of APS, indicating that rDV has biological activity consistent with that of natural ß2GPI. The obtainment of rß2GPI-DV and the establishment of the method in rß2GPI-DV binding to oxLDL in this study lay a foundation for the early laboratory diagnosis of APS.

Key words：Antiphospholipid syndrome；Beta 2-glycoprotein Ⅰ；Cardiolipin；Oxidized lowdensity protein；Prokaryotic expression

---

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No: 81202536，81270361，30971232）
作者单位：116622 大连经济技术开发区，大连大学生命科学与技术学院
＊通讯作者：迟彦，Tel：0411-87402337；E-mail：chi_yan@126.com

抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome，APS) 是一种累及多器官、系统的自身免疫病，其临床表现为动静脉血栓形成、自发性流产[1]。抗磷脂综合征的血清学特征主要表现为大量抗磷脂抗体(antiphospholipid antibody，aPL)的出现。研究发现，aPL 所针对的靶抗原并非磷脂，而是一大类与磷脂结合的蛋白，其中磷脂结合蛋白β2 糖蛋白Ⅰ(beta 2-glycoprotein Ⅰ，β2GPⅠ) 是 aPL 的主要抗原[2, 3]。

β2GPⅠ 主要在肝脏合成，也可表达在其他细胞中。成熟的人β2GPⅠ分子量为 50KD 左右，由 326 个氨基酸残基组成，包含 5 个结构域，从氨基端到羧基端依次为 I，II，III，IV 和 V 区。β_2-GPI 前 4 个结构域高度同源，各含约 60 个氨基酸残基，各区均有四个半胱氨酸（Cys），组成两个二硫键。然而β2-GPI 的第五结构域（羧基端）则是另一种形式，它含有 82 个氨基酸，其中 6 个半胱氨酸组成三对二硫键，即 Cys^{245}-Cys^{296}，Cys^{281}-Cys^{306}, Cys^{288}-Cys^{326}。研究认为，β2GPⅠ第五结构域（DV）C 末端富含正电荷的 C281KNKEKKC288 区[4-7]以及由丝氨酸(Ser) 311～赖氨酸(Lys) 317 的 7 个氨基酸形成的疏水性袢[8-10]参与了与带负电荷物质如心磷脂、肝素、阴性磷脂等的结[11,12]。

研究显示，APS病人血清中oxLDL水平较高，当β2GPⅠ通过DV结构域与阴性磷脂oxLDL结合后，隐藏于第1[13]或第4功能域[14]的抗原决定基被暴露出来，进而被抗β2GPⅠ 抗体所识别[15]，形成β2GP/oxLDL/抗β2GPⅠ抗体三元复合物被巨噬细胞吞噬摄取形成泡沫细胞，是APS疾病动脉血栓形成的关键事件[16]。因此认为，血清中oxLDL水平是APS病人发生动脉血栓的主要风险因素[17]。

本研究通过构建编码β2GPⅠ第五结构域（ß2GPⅠ-DⅤ）、ß2GPⅠ-DⅤ突变体及ß2GPⅠ-DⅤ的Phe280-Ala320片段的原核表达载体，并对其进行诱导表达和纯化，解析了β2GPⅠ-DV与阴性磷脂心磷脂（cardiolipin，CL）结合的分子机制。在此基础上，获得有结合阴性磷脂生物学活性的重组ß2GPⅠ-DⅤ结构域（rß2GPⅠ-DⅤ），为检测APS病人血清中阴性磷脂oxLDL水平及并最终APS临床实验室诊断奠定基础。

1 材料与方法

1. 1 材料

人源β2-GPI T 载体(CTA727-1) 、JM109 克隆菌、Rosetta-gami (DE3) 菌

株为本实验室保存； oxLig-1 为本实验室合成保存; pET-32a-c (+) 表达载体购自Novagen 公司； DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 、胰蛋白胨、酵母提取物以及琼脂购自Bio Basic 公司；LA Taq 酶、DNA 连接试剂盒、T 载体(TaKaRa PMD19-T simple vector) 、限制性内切酶EcoR I 与Kpn I、DNA Marker DL 2 000 与λHind III digest DNA Marker 均为TaKaRa 公司产品; ECL 显色试剂盒、HisTrp affinity columns 购自GE healthcare; Anti-His Antibody 购自天根生化科技公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG 为Santa Cruz 公司产品；CL 购自Sigma Chemical; human β2-GPI 购自Yamasa，Japan；PCR引物合成及DNA 测序由TaKaRa 公司完成；抗β2-GPI抗体由Eiji Matsuura 教授(Okayama University，Japan)惠赠。

1. 2 方法

1. 2. 1 β2GPI-DV 、β2GPI-DV突变体及β2GPⅠ-DⅤ Phe^{280}-Ala^{320}片段的基因克隆

根据Genbank上发表的β2GPI cDNA序列，遵循PCR引物设计原则，以软件primer5. 0设计扩增引物。

（1）β2GPI-DV 引物设计：

上游引物（引物 1：45bp）：

5’-CGG *GGTACC* **GACGACGACGAC** GGACGGACCTGTCCCAAGCCAGAT-3’

下游引物（引物 2：32bp）：

5’-CG *GAATTC* TTAGCATGGCTTTACATCGGATGC-3’

其中引物 1 中 5’端含有 *Kpn*I 酶切位点、保护碱基、EK 酶切位点以及β_2GPI 5’端部分氨基酸编码基因序列；引物 2 中 5’端含有 5’端含有 *Eco*RI 酶切位点、保护碱基以及β_2-GPI 3’端部分氨基酸编码基因的互补序列。

（2）β_2GPI-DV 突变体（mutant DNA，以下简称 mDV)引物设计：

上游引物(引物 3)：

5’- GTCATCGGCCATGGGACGACGACGACGCATCTggcAAAGTACCTGTG -3’

下游引物(引物 4)：

5’- AGCTCACGGGATCCTTAggcTGGCTTTACATCGG-3’

其中引物 3 中 5’端含有 *Nco*I 酶切位点、保护碱基、EK 酶切位点以及β_2GPI

-mDV5'端部分氨基酸编码基因序列，小写字母为点突变处；引物 4 中含有 5'端含有 *Bam*HI 酶切位点、保护碱基以及β$_2$GPI-mDV 3'端部分氨基酸编码基因的互补序列，小写字母为点突变处。

（3）β2GPI-DV 结合阴性磷脂活性中心片段 (以下简称 cDV)引物设计：

上游引物(引物 5：52bp)：

5'-CATGCCATGGGACGACGACGACTTCTGCAAAAATAAGGAAAAGAAGTG
TAGC-3'

下游引物(引物 6：40bp)：

5'-CGGGATCCGCCTGAGCCACCTGCATCAGTTTTCCAAAAAG-3'

其中引物 1 中 5'端含有 *Nco*I 酶切位点、保护碱基、EK 酶切位点以及β2GPI -cDV5'端部分氨基酸编码基因序列；引物 2 中 5'端含有 5'端含有 *Bam*HI 酶切位点、保护碱基以及β2-GPI cDV 3'端部分氨基酸编码基因的互补序列。

以实验室保存的人源β2-GPI T 载体为模板，分别以引物1、2 和引物5、6 进行PCR。PCR 反应条件均为： 94℃预变性1 min；94℃变性10 s，55℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共30 个循环；72℃终延伸10 min。取PCR 产物进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，凝胶回收试剂盒回收目的基因，并连接至pMD19-T simple vector。将连接产物转化JM109 感受态菌，Ampicillin(50μg/mL)抗性筛选后进行PCR 鉴定，并挑选阳性克隆扩大培养后提取质粒，送至TaKaRa 公司测序。测序结果与GenBank 中的人β2-GPI序列比对，鉴定序列正确后将重组质粒分别命名为pMD19T-DV，pMD19T-mDV，pMD19T-cDV。

1.2.2 重组表达载体的构建及鉴定

将pMD19T-DV，pMD19T-mDV，pMD19T-cDV重组质粒于大肠杆菌JM109中扩增，提取重组质粒和pET32a-c(＋) 载体质粒，分别用*Eco*RI和*Kp* I(DV)、*Nco*I和*Bam*HI(mDV、cDV)进行双酶切。回收酶切产物DV 、mDV和cDV目的片段，TaKaRa 连接试剂盒16℃连接1h。将连接产物转化JM109感受态细胞，涂布到Ampicillin(50 μg/mL) 抗性固体培养基。培养16 h后挑选阳性菌落进行菌落PCR，并扩大培养后提取质粒，进行*Eco*R I和*Kpn*I、*Nco*I(DV)和*Bam*HI(mDV、cDV)双酶切鉴定。

1.2.3 rDV、rmDV以及rcDV 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达以及纯化

将鉴定正确的rDV、rmDV以及rcDV表达载体分别转化Rosetta-gami 感受态

细胞，接种于含有Tetracycline (12. 5 μg/mL)、Ampicillin (50 μg/mL) 、Kanamycin (15 μg/mL) 的LB固体培养基，37℃过夜培养后挑选阳性菌落扩大培养至OD600nm =0. 5左右。加0. 5 mmol /L IPTG，37℃继续诱导培养6 h。6 000 r/min 离心10 min 收集菌体。将菌体冰浴超声破碎后，4℃ 10 000r/min 离心10 min取上清，0. 45 μm 滤膜过滤上清后，镍离子亲和层析柱纯化蛋白。

1.2.4 表达产物的Western blot 分析

将纯化后的rDV、rmDV以及rcDV蛋白进行15% SDS-PAGE 电泳，电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜，5% BSA 封闭1 h，TBST 清洗5次。Anti-His Antibody 一抗4℃ 摇摆平台过夜孵育，清洗同上。HRP 标记山羊抗鼠二抗孵育1h，清洗同上。ECL 显色，暗室中曝光5 min，显影定影后将底片在凝胶成像系统下成像。

1.2.5 **HPTLC 检测重组蛋白与CL的结合**

将CL (50 μg/plate) 在硅胶板上点样，以展开剂氯仿：甲醇= 8：1 展开，1% gelatin 37℃封闭1h。随后分别孵育rDV、rmDV以及rcDV，37℃ 1h。孵育Anti-His Antibody 一抗，37℃ 1h。孵育HRP 标记的山羊抗鼠二抗，37℃ 1h。PBST 清洗后以5 mL 4-methoxy-1-naphtol 甲醇溶液(3 mg /mL) 、25 mL Tris-HCL(pH7. 4) 、3. 5 μL 30 % H_2O_2配成显色液对硅胶板显色10 min。

1.2.6 ELISA检测重组蛋白与CL的结合

包被CL (50 μg/mL，50 μL/well) 于96 孔板，1 % gelatin 37℃封闭1h，PBST(200μL/well) 洗板三次。随后分别孵育rDV、rmDV以及rcDV (50μg/mL，50μL/well) ， 37℃ 1h，清洗同上。孵育Anti-His Antibody 一抗(1:1 000 稀释) ，37℃ 1h，清洗。孵育HRP标记的山羊抗鼠二抗(1:1 000 稀释) ，37℃ 1h，清洗。OPD显色后于492 nm 下用酶标仪检测光吸收值。

1.2.7 ELISA法检测rβ2GPI-DV与oxLDL及APS病人血清中oxLDL结合的生物学活性

rβ2GPI-DV 蛋白、天然β2GPI 蛋白 (nβ2GPI，100μg/ml，50μl/well）包被于96孔板，吹风机冷风吹干。1% geletin（100μl/well)37℃封闭 1h。PBST（200μl/well）清洗 4 次。37℃分别孵育 oxLDL、LDL 及 APS 病人血清（50μg/ml，50μl/well）1h。清洗同上，37℃孵育抗 apoB 抗体稀释液（50μl/well）1h。清洗后 37℃孵育 HRP 标记的山羊抗鼠二抗（1:1000、50ul/well）1h。PBST 清洗多次后 OPD 显色，酶标仪 492nm 处读取吸光度值。

2 结果

2. 1 β2GPI-DV 、β2GPI-DV突变体及β2GPI-DV结合阴性磷脂活性片段的基因的克隆

rDV、rmDV以及rcDV基因的PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析，条带大小均与GenBank中一致(图1) 。随后将目的基因克隆至pMD19-T simple载体，得pMD19T-DV，pMD19T-mDV，pMD19T-cDV。提取质粒，经TaKaRa公司测序，Sequencher软件比对分析，目的片段无突变。

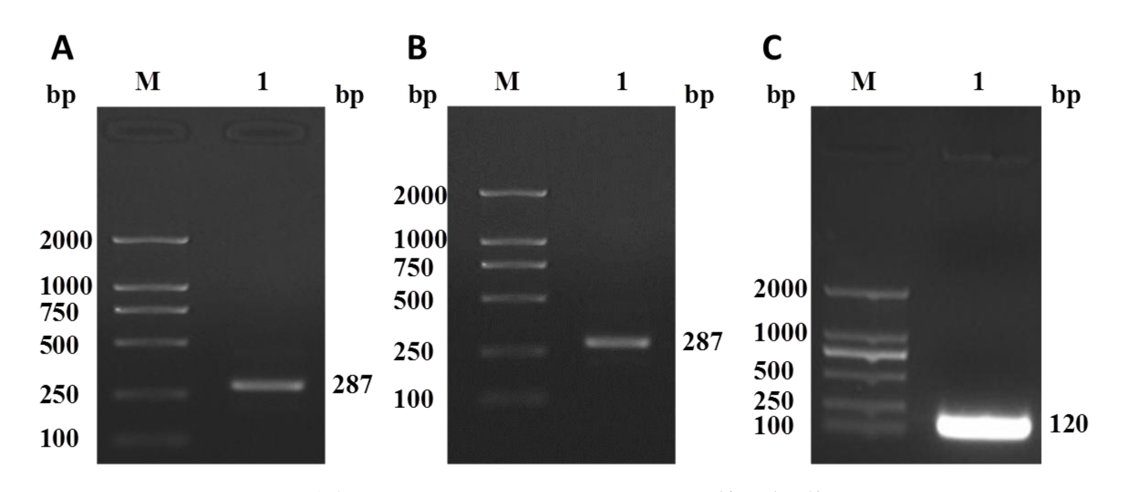


图1. rDV、rmDV以及rcDV PCR 基因扩增

Fig. 1 PCR amplification of rDV、rmDV and rcDV

A: PCR product of rDV．M：DNA Marker；1：PCR product of rDV (287 bp)

B: PCR product of rmDV．M：DNA Marker；1：PCR product of rmDV（287 bp)

C: PCR product of rcDV．M：DNA Marker；1：PCR product of rcDV（120 bp)

2. 2 重组pET32a-DV，pET32a-mDV，pET32a-cDV 表达载体的构建及鉴定

pMD19T-DV质粒用*Kpn*I和*Eco*RI双酶切、pMD19T-mDV与pMD19T-cDV质粒用 *Nco*I和*Bam*HI 进行双酶切后获得目的基因片段，分别连接至经同样酶切的pET32a-c(+)表达载体。将连接后的表达载体pET32a-DV，pET32a-mDV，pET32a-cDV转化JM109克隆菌，涂布Ampicillin 抗性平板，分别挑选阳性克隆培养。提取质粒进行*Kpn*I和*Eco*RI 、*Nco*I和*Bam*HI双酶切，经琼脂糖凝胶电泳分析，目的片段正确连接至表达载体pET-32a-c(+)（图2）。

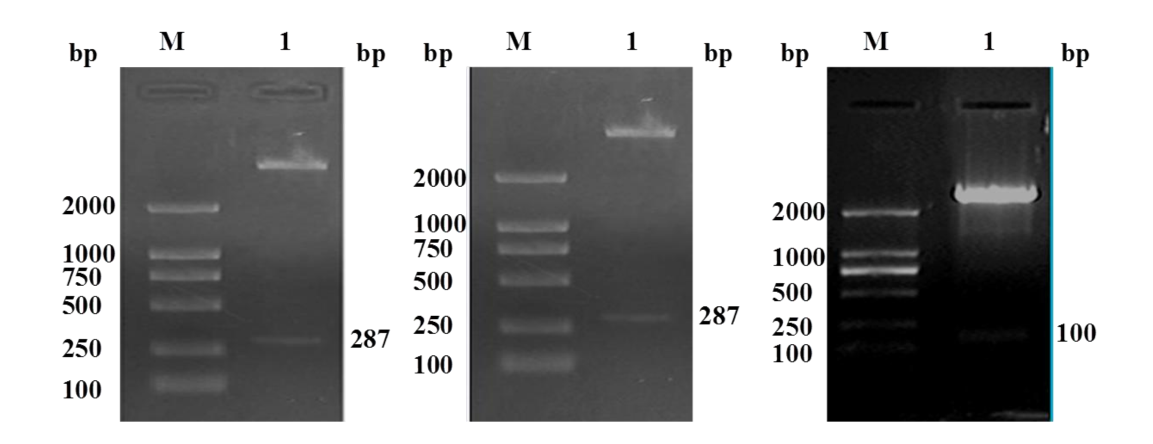


图2. 表达载体酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant vectors by restriction enzyme digestion

A: Identification of pET32a-DV by restriction enzyme digestion. M: DNA Marker; 1: pET32a-DV digested with *Eco*R I and *Kpn*I

B: Identification of pET32a-mDV by restriction enzyme digestion. M: DNA Marker; 1: pET32a-mDV digested with *Nco*I and *Bam*HI

C: Identification of pET32a-cDV by restriction enzyme digestion. M: DNA Marker; 1: pET32a-cDV digested with *Nco*I and *Bam*HI

2.3 rDV 、rmDV和 rcDV蛋白在大肠杆菌中的诱导表达以及纯化

pET32a-DV，pET32a-mDV，pET32a-cDV表达载体分别导入Rosetta-gami 表达菌中，经IPTG 诱导表达后进行菌体全蛋白SDS-PAGE电泳分析，在29kDa、29kDa以及26kDa左右有明显的条带（图3），说明rDV 、rmDV和 rcDV蛋白在大肠杆菌中得到表达。

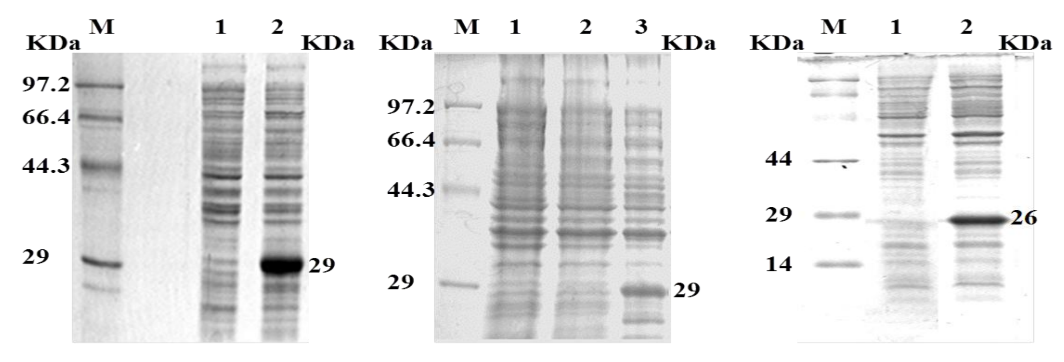


图3. rDV 、rmDV和 rcDV的诱导表达

Fig.3 Expression of rDV, rmDV and rcDV

A: Expression of rDV. M: marker；1：without induction；2: induction

B: Expression of rmDV. M: marker；1：control; 2: without induction；3: induction

C: Expression of rcDV. M: marker；1：without induction；2: induction

rDV 、rmDV和 rcDV均为可溶表达，收集菌体超声破碎，离心取上清过滤后用镍离子亲和层析柱纯化蛋白。取纯化后rDV 、rmDV和rcDV进行SDS PAGE电泳分析。如图4所示，蛋白经纯化后已出去打部分杂蛋白，经Bandscan软件分析，重组蛋白的纯度均在90%以上。

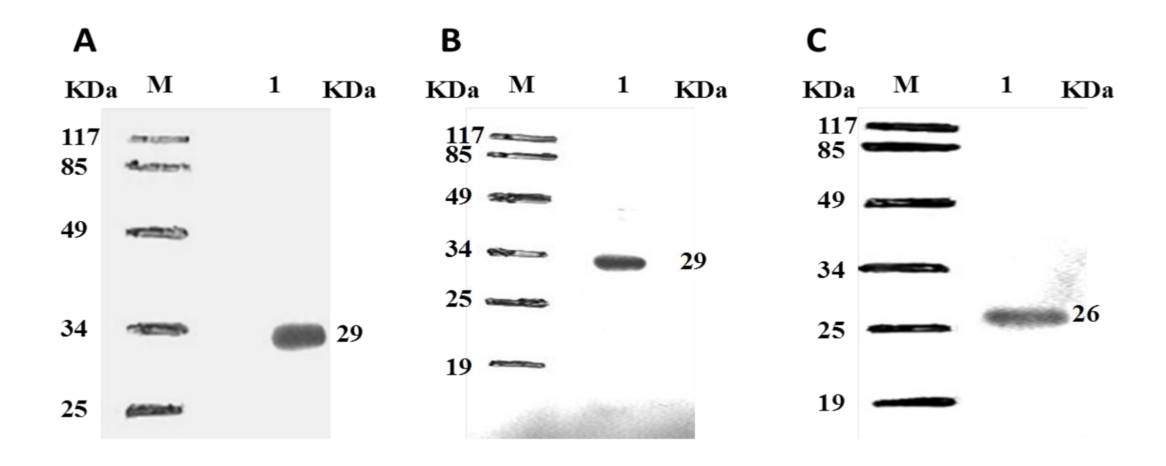


图4 rDV 、rmDV和 rcDV的纯化
Fig. 4 Purification of rDV, mDV and cDV
A: Purification of rDV. M: marker；1: Purification of rDV
B: Purification of rmDV. M: marker；1: Purification of rmDV
C Purification of rcDV. M: marker；1: total protein; 2: Purification of rcDV

2. 4 rDV 、rmDV和 rcDV蛋白Western blot 分析

以Anti-His Antibody 对rDV 、rmDV和 rcDV蛋白进行Western blot分析，添加His标签的rDV 、rmDV和 rcDV蛋白可与Anti-His Antibody特异性结合(图5) ，均呈现预计大小的目的条带。

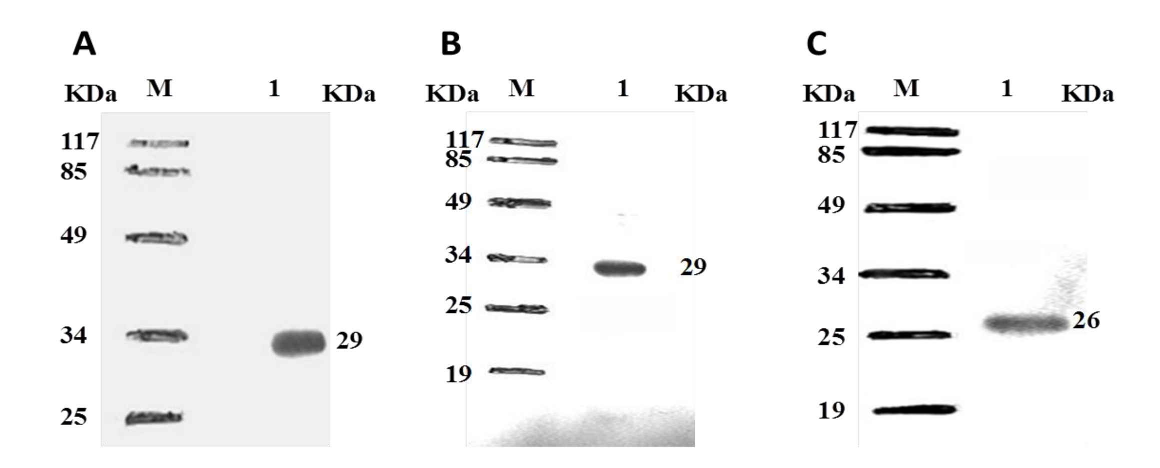


图5. rDV 、rmDV和 rcDV的Western blot分析
Fig. 5 Analysis of rDV, rmDV and rcDV by Western blot
A: Analysis of rDV by Western blot.
B: Analysis of rmDV by Western blot.
C: Analysis of rcDV by Western blot.

2.4 HPTLC 方法检测 rDV 、rmDV 和 rcDV 蛋白结合 CL 的活性

以 nβ2GPⅠ作为阳性对照，HPTLC 方法检测 rDV 、rmDV 以及 rcDV 对 CL 的结合活性。结果如图 6.A 所示， rDV 与 nβ2GPⅠ一样，在相同位置出现特异性斑点，而 rmDV 以及 rcDV 没有出现斑点。由此证明 rDV 蛋白可以与 CL 特异性结合，并具有一定生物学活性，而 rmDV 以及 rcDV 没有与阴性磷脂结合的活性。

2. 5 ELISA方法检测rDV 、rmDV和 rcDV蛋白结合CL 的活性

以nβ2GPⅠ作为阳性对照，ELISA方法检测rDV、rmDV以及rcDV对CL的结合活性。结果如表1和图6.B所示，rDV可以与CL特异性结合，具有一定活性，而rmDV和rcDV不具有同CL结合的生物学活性。

Table1 Analysis of rDV，rmDV and rcDV binding with CL by ELISA

表1. ELISA方法检测 rDV、rmDV和 rcDV与CL的结合活性

Absorbance at 492nm				
$n\beta_2GPI$	rDV	rmDV	rcDV	Blank
2.132	2.234	0.453	0.357	0.389
1.953	2.456	0.388	0.422	0.298
1.885	2.135	0.223	0.298	0.327

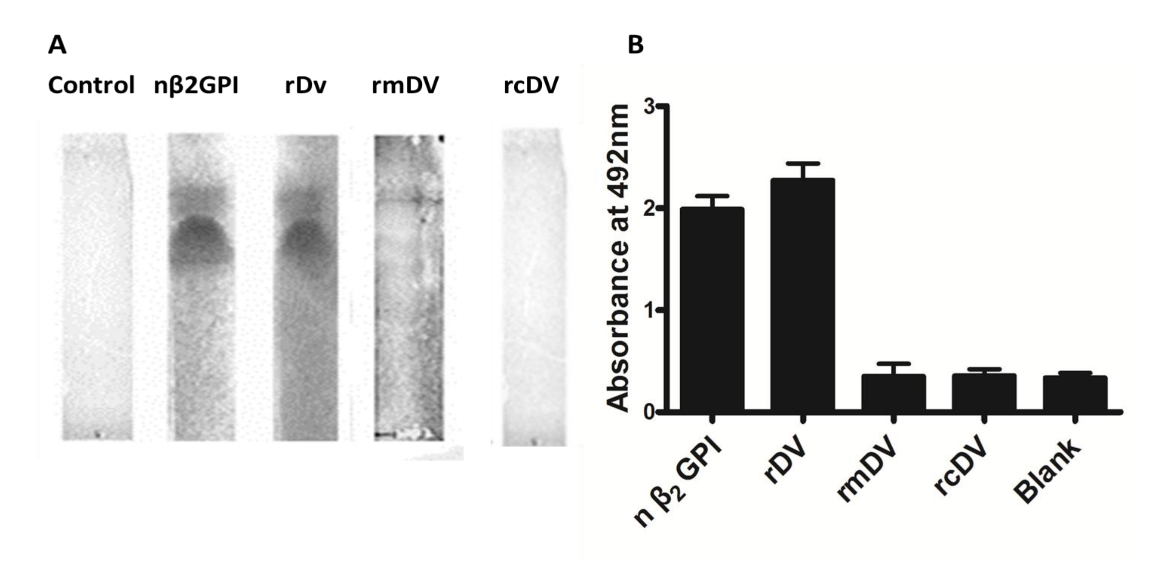


图6. rDV 、rmDV和 rcDV与CL结合的HPTLC和ELISA分析

Fig.6 Analysis of rDV，rmDV and rcDV binding with CL by HPTLC and ELISA

A. CL (50 μg each plate) was spotted on HPTLC plate, developed with solution of chloroform/methanol (8:1, v/v), incubated with recombinant proteins and its related antibodies （WB-CAL-I for n$β_2$GPⅠ, anti-His Antibodies for rDV, rmDV and rcDV）.

B. CL (50 μg each plate) was coated, incubated with nβ2GPⅠ, rDV, rmDV or rcDV. The plates were probed by WB-CAL-1(for nβ2GPⅠ) and anti-His antibodies (for rDV, rmDV and rcDV), while blank is without the primary antibody. Observation wavelength in 492 nm.

2.6 ELISA方法检测rβ2GPI-DV蛋白与oxLDL及APS血清中oxLDL的结合活性

上述已经证明 rDV 而非其突变体或短肽具有结合磷脂磷脂 CL 的生物学活性，但 rDV 是否能与 oxLDL，进一步与 APS 病人血清中 oxLDL 相结合还是未知。为进一步检测 rDV，即 rβ2GPI-DV 与 oxLDL 结合的生物学活性，将 nβ2GPI/rβ2GPI-DV 分别包被，随后分别孵育 Cu^{2+}氧化得到的 oxLDL、LDL、以及 APS 病人血清。清洗后加入抗 apoB 抗体，最后以 OPD 显色。结果如表 2 和图 7A 所示，rβ2GPI-DV 能够与 Cu^{2+}的 oxLDL 相结合，而不能与 LDL 结合，表 3 和图 7B 显示 rβ2GPI-DV 同 nβ2GPⅠ相一致，能够与病人血清中的 oxLDL 相结合。以上实验数据证明 rβ2GPI-DV 蛋白具有与 nβ2GPI 相一致的生物学结合活性。

Table2 Analysis of rβ2GPI-DV binding with oxLDL by ELISA

表 2. ELISA 方法检测 rβ$_2$GPI-DV 蛋白与 oxLDL 的结合活性

Absorbance at 492nm			
nβ$_2$ GPI+oxLDL	rβ$_2$GPI-DV+oxLDL	rβ$_2$ GPI-DV+LDL	Negative control
2.513	2.353	0.253	0.123
2.555	2.423	0.268	0.158
2.463	2.388	0.239	0.163

Table3 Analysis of rβ$_2$GPI-DV binding with oxLDL in APS serum by ELISA

表 3. ELISA 方法检测 rβ$_2$GPI-DV 蛋白与 APS 血清 oxLDL 的结合活性

	Absorbance at 492nm		
	Blank	nβ$_2$GPI	rβ$_2$GPI-DV
serum#3	0.1530	0.866	0.855
serum#2	0.1250	0.799	0.750
serum#1	0.1300	0.981	0.893

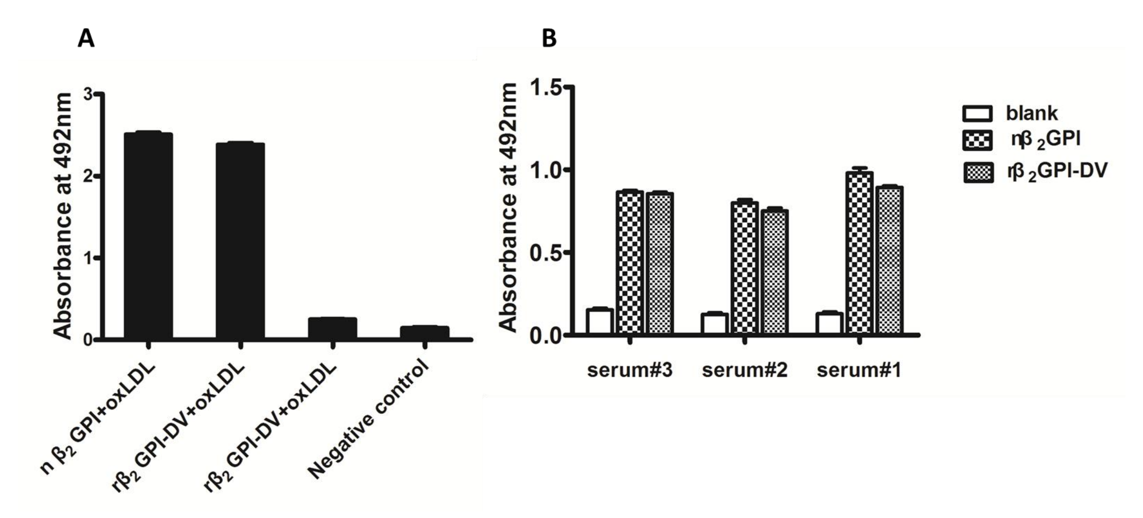


图 7. ELISA 方法检测 rβ$_2$GPI-DV 蛋白与 oxLDL 及 APS 血清 oxLDL 的结合活性

Fig.7 The binding activity of rβ$_2$GPI-DV to oxLDL and oxLDL in APS serum

A: Lane 1: incubated with natural nβ$_2$GPI and oxLDL oxidized by Cu^{2+}. Lane 2: incubated with rβ$_2$GPI-DV and oxLDL oxidized by Cu^{2+}. Lane 3: incubated with rβ$_2$GPI-DV and LDL； Lane 4: negative control.

B:The rβ$_2$GPI-DV/the nβ$_2$GPI(50 μg/ml， 50 μl) were coated, incubated with the serum from the patients with APS (100-fold diluted). The plates were probed by HRP-labeled anti-apoB-100 Ab, while control is without the the serum from the patients ,Observation wavelength in 492 nm

讨论：

β2GPI 分子量约为 50kD，由 326 个氨基酸残基组成。X 线晶体衍射分析发现，β_2GPI 由 5 个 SCR 重复区串联，形成鱼钩状结构，其中第 5 个 SCR 区与前 4 个 SCR 区差异较大。I-IV 区都是由 60 个氨基酸残基组成，各有四个半胱氨酸 (Cys)，组成两个二硫键，I、III、IV 区共 7 个β折叠片，II 区有 6 个，而 V 结构域由 82 个氨基酸组成，含有 3 个二硫键，四个β折叠片。在β_2GPI 与阴性电荷物质相互结合这一过程中，这一结构域发挥重要作用。研究认为，β_2GPI-DV 中两个区域协同负责同阴性磷脂的结合。其中之一为 Cys^{281}-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys-Cys^{288} 这一区域，这一区域由于富含正电荷而易于同负电荷物质结合[18,19]。另一区域为 Ser^{311}-Lys^{317}，这一区域中的 Leu^{313}-Ala-Phe-Trp^{316} 片段包含了四个高度保守的疏水氨基酸形成一个疏水绊环，利于脂类物质的结合[20,21]。

β2GPⅠ第五结构域介导的β2GPⅠ与阴性磷脂的结合，是β2GPⅠ发挥生理功能及参与病理过程的基础。为解析β2GPⅠ第五结构域与阴性磷脂结合的分子机制，更深入的理解和研究β2GPⅠ的生理功能和参与的病理过程，我们首先利用原核表达系统对β2GPⅠ-DV（Ser^{244}-Cys^{326}）进行表达及纯化，HPTLC及ELISA结果显示纯化的DV重组蛋白具有与阴性磷脂CL结合的生物学活性。进一步的，为了寻找最小能结合CL的DV中的功能肽段，我们设计引物，以β2GPⅠ-DV为模板，扩增出了包含C^{281}-C^{288}以及Ser^{311}-Lys^{317}负责与CL结合的功能肽段，即Phe^{280}-Ala^{320}包含40个氨基酸的短肽片段。同样经构建、诱导表达和纯化后，检测其结合活性，发现Phe^{280}-Ala^{320}短肽片段，即我们命名为rcDV蛋白无法与CL结合。rcDV短肽片段即使是包含了负责与阴性磷脂结合的两个功能区段也无法与CL结合，分析原因，我们发现在β2GPⅠ-DV中存在三个二硫键，分别为C^{245}-C^{296}，C^{281}-C^{306}, C^{288}-C^{326}，而我们表达的短蛋白(cDV) ，即Phe^{280}-Ala^{320}区段，正是破坏了Cys^{245}-Cys^{296}、Cys^{288}-Cys^{326}两对二硫键的正确形成，从而导致负责与阴性磷脂结合的Cys^{281}-Cys^{288}以及Ser^{311}-Lys^{317}区段在空间上不能维持一定的构型。因此我们推测，两段功能区段在空间上维持一定构型可能是与阴性磷脂结合的前体条件，而我们重组表达的Phe^{280}-Ala^{320}短肽片段可能是破坏了Cys^{281}-Cys^{288}以及Ser^{311}-Lys^{317}两个肽段的空间构象，导致其失去与CL结合的能力。为了验证我们的推测，我们将形成二硫键所必须的氨基酸Cys^{245}和Cys^{326}点突变为Gly，然后再实现其（mDV）诱导表达和纯化，结果显示，经过点突变后，rmDV果然如预期所示不再同rDV一样具备与CL结合的生物学活性，从而更进一步证实了我们的推

测，即β_2GPI-DV中Cys^{281}-Cys^{288}以及Ser^{311}-Lys^{317}区段在空间上维持一定构型是与CL结合所必须的前提条件，而C^{245}-C^{296}，C^{288}-C^{326}两个二硫键在维持二者空间构型方面起到一定的作用。

在解析 rDV 结合阴性磷脂分子机制，证明我们表达的 rDV 而非其短肽或者突变体能够同阴性磷脂 CL 结合基础上，需要进一步检测 rβ_2GPI-DV 是否能够同阴性磷脂 oxLDL 相结合，为此，我们利用 Cu^{2+}氧化 LDL 得到 oxLDL，以未氧化 LDL 做对照，ELISA 证明 rβ_2GPI-DV 具有同天然β_2GPI 相似的结合 oxLDL 活性。由于 APS 病人血清中 oxLDL 的水平含量较高，因此通过检测β_2GPI-DV 与 oxLDL 的结合可以作为检测 APS 病人血清中 oxLDL 水平的检测方法，为 APS 疾病的早期诊断提供实验室依据。为此，我们选取三例 APS 继发动脉血栓的病人血清作为检测对象，ELISA 实验表明，rβ_2GPI-DV 能够同 nβ_2GPI 相一致，检测出 APS 血清中的 oxLDL 含量。

由此，本研究解析了rDV结合阴性磷脂的分子机制，在此基础上，获得有结合阴性磷脂生物学活性的重组结构域，为检测APS病人血清中阴性磷脂oxLDL水平及并最终APS临床实验室诊断奠定基础。

参考文献

[1] Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. J Rheumatol, 1986, **13**(3):486-489.

[2] Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet, 1990, 335(8705):1544-1547.

[3] McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, et al. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) . Proc Natl Acad Sci U S A , 1990, 87(11):4120-4124.

[4] Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA, Koike T. Human beta2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using mutants expressed by a baculovirus system. Blood. 1996, 87(8):3262-70.

[5] Hunt J, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. J Immunol. 1994, 152(2):653-659.

[6] Sheng Y, Sali A, Herzog H, Lahnstein J, Krilis SA. Site-directed mutagenesis of recombinant human beta 2-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity. J Immunol. 1996, 157(8):3744-51.

[7] Dupuy D'Angeac A, Stefas I, Graafland H, De Lamotte F, Rucheton M, Palais C, Eriksson AK, Bosc P, Rose C, Chicheportiche R. Biotinylation of glycan chains in beta2 glycoprotein I induces dimerization of the molecule and its detection by the human autoimmune anti-cardiolipin

antibody EY2C9. Biochem J. 2006, 393(Pt 1):117-27.

[8] Palomo I, Pereira J, Alarcon M, Vasquez M, Pinochet C, Poblete F, Mendez E, Sandoval J, Vidal R, Pierangeli S. Val/Leu247 and Trp/Ser316 polymorphisms in beta 2 glycoprotein I and their association with thrombosis in unselected Chilean patients. Clin Rheumatol. 2007, 26(3):302-7.

[9] Sanghera DK, Wagenknecht DR, McIntyre JA, Kamboh MI. Identification of structural mutations in the fifth domain of apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I) which affect phospholipid binding. Hum Mol Genet. 1997, 6(2):311-6.

[10] Mehdi H, Naqvi A, Kamboh MI. A hydrophobic sequence at position 313-316 (Leu-Ala-Phe-Trp) in the fifth domain of apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I) is crucial for cardiolipin binding. Eur J Biochem. 2000, 267(6):1770-6.

[11] Steinkasserer A, Estaller C, Weiss EH, Sim RB, Day AJ. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I. Biochem J. 1991, 277 (Pt 2):387-91.

[12] Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, Derksen RH, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. EMBO J. 1999, 18(19):5166-74.

[13] Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A: Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. Arthritis Rheum, 2007, 56(1):280-290.

[14] Kasahara H, Matsuura E, Kaihara K, et al. Antigenic structures recognized by anti-beta2-glycoprotein I auto-antibodies. Int Immunol, 2005, 17(12):1533-1542.

[15] Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, et al. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. J Exp Med, 1994, 179(2):457-462.

[16] Li J, Chi Y, Liu S, Wang L, Wang R, Han X, Matsuura E, Liu Q. Recombinant domain V of beta2-glycoprotein I inhibits the formation of atherogenic oxLDL/beta2-glycoprotein I complexes. J Clin Immunol. 2014, 34(6):669-76.

[17] da Silva FF, Levy RA, de Carvalho JF. Cardiovascular risk factors in the antiphospholipid syndrome. J Immunol Res. 2014, 2014:621270.

[18] Itabe H, Yamamoto H, Suzuki M, Kawai Y, Nakagawa Y, Suzuki A, Imanaka T, Takano T. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by monoclonal antibody against oxidized low density lipoprotein. J Biol Chem. 1996, 271(52):33208-17.

[19] Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC, Suzuki K. beta 2-Glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. Thromb Haemost. 1996, 75(1):49-55.

[20] Zhang M, Liu B, Zhang Y, Wei H, Lei Y, Zhao L. Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and Clostridium leptum subgroup in patients with ulcerative colitis. J Clin Microbiol. 2007, 45(2):496-500.

[21] Rahgozar S, Yang Q, Giannakopoulos B, Yan X, Miyakis S, Krilis SA. Beta2-glycoprotein I binds thrombin via exosite I and exosite II: anti-beta2-glycoprotein I antibodies potentiate the inhibitory effect of beta2-glycoprotein I on thrombin-mediated factor XIa generation. Arthritis Rheum. 2007, 56(2):605-13.